

(1)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-052849

(43)Date of publication of application : 02.03.1993

(51)Int.Cl.

G01N 33/553

G01N 33/543

(21)Application number : 03-240216

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 28.08.1991

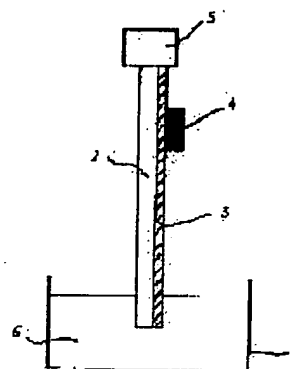
(72)Inventor : MIYAMOTO IKUO

(54) SPECIFIC DETECTION AND SEPARATION METHOD FOR SAMPLE

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable detection simply and at a high sensitivity by forming a magnetic reaction product from a material to be measured and a magnetic specific reaction material to trap the product on a chromatographic medium by a magnetic force.

CONSTITUTION: A medium 6 containing an antigen as substance to be measured is placed into a container 1 and when a magnetic antibody reacting specifically to the antigen and an antibody which labeled reacting specifically to the antigen at a part differing from the magnetic antibody are added to the medium, a reaction product magnetic and labeled too is generated by an antigen/antibody reaction. As a sample 6 containing the reaction product moves in capillarity toward a water absorbing body 5 on a chromatographic medium 2, the reaction product is trapped on the medium 2 by a magnetic force at a position where a magnet 4 is provided while a development by a label occurs at the position. Thus, the presence and quantity of the antigen are detected in the sample 6 by checking the presence, intensity, color tone and the like of the development of the label at the position of the magnet 4 on the medium 2.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-52849

(43)公開日 平成5年(1993)3月2日

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 33/553

33/543

機別記号

庁内整理番号

F-I

技術表示箇所

9015-2 J

P 7906-2 J

審査請求 未請求 請求項の数8(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平3-240216

(22)出願日 平成3年(1991)8月28日

(71)出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72)発明者 宮本 郁夫

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

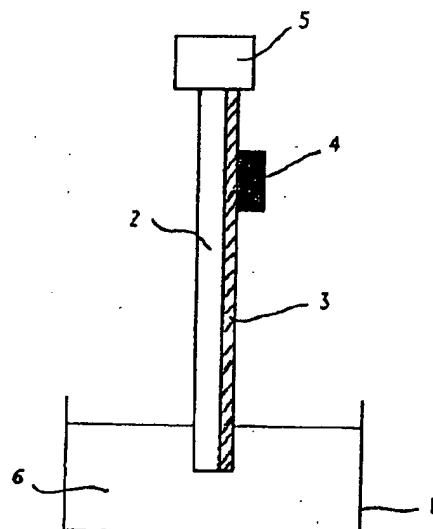
(74)代理人 弁理士 辻 良子

(54)【発明の名称】 検体の特異的検出および特異的分離方法

(57)【要約】

【構成】 検体中の測定対象物質を、①それと特異的に反応する磁性を有する物質及び該磁性を有する物質とは異なる部位で該測定対象物質と特異的に反応する標識された物質と反応させるか、又は②それと特異的に反応する磁性を有する物質と該磁性を有する物質に対して測定対象物質と競合的に反応する標識された物質の存在下に反応させるか、或いは③それと特異的に反応する標識された物質と該標識された物質に対して該測定対象物質と競合的に反応する磁性を有する物質の存在下に反応させた後、①～③で生成した磁性を有する反応物を毛管移動させ特定の位置で磁力で捕捉して特異的に検出する方法。

【効果】 検体中の測定対象物質と特異的に反応する物質等のクロマトグラフ媒体上への固定化や固液分離が不要であり、検体中の測定対象物質を極めて簡単に且つ高感度で検出することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体中の測定対象物質を、それと特異的に反応する磁性を有する物質、および該磁性を有する物質とは異なる部位で該測定対象物質と特異的に反応する標識された物質と反応させ、磁性を有し且つ標識された反応生成物を毛管移動させると共に毛管移動媒体の特定の位置で磁力によって捕捉することを特徴とする検体中の測定対象物質の特異的検出方法。

【請求項2】 検体中の測定対象物質を、それと特異的に反応する磁性を有する物質と、該磁性を有する物質に対して該測定対象物質と競合的に反応する標識された物質の存在下に反応させ、反応生成物を毛管移動させると共に、毛管移動媒体の特定の位置に磁力によって磁性を有する反応生成物を捕捉することを特徴とする検体中の測定対象物質の特異的検出方法。

【請求項3】 検体中の測定対象物質を、それと特異的に反応する標識された物質と、該標識された物質に対して該測定対象物質と競合的に反応する磁性を有する物質の存在下に反応させ、反応生成物を毛管移動させると共に、毛管移動媒体の特定の位置に磁力によって磁性を有する反応生成物を捕捉することを特徴とする検体中の測定対象物質の特異的検出方法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項の方法を実施するのに使用する、検体中の測定対象物質と特異的に反応する磁性を有する物質、該磁性を有する物質とは異なる部位で該測定対象物質と特異的に反応する標識された物質、該磁性を有する物質に対して該測定対象物質と競合的に反応する標識された物質、該測定対象物質と特異的に反応する標識された物質および該標識された物質に対して該測定対象物質と競合的に反応する磁性を有する物質の各々の乾燥物、またはそれらの乾燥物の組み合わせ体。

【請求項5】 請求項4の乾燥物質を、請求項1～3のいずれか1項の方法を実施し得るように、毛管移動媒体の特定位置に予め配置した検査用キット。

【請求項6】 毛管移動媒体の特定位置に磁場発生部材を配置した請求項5の検査用キット。

【請求項7】 検体中の分離対象物質を、それと特異的に反応する磁性を有する物質と反応させ、その磁性を有する反応生成物を毛管移動させると共に毛管移動媒体の特定の位置で磁力によって捕捉し分離することを特徴とする検体中の分離対象物質の分離方法。

【請求項8】 請求項7の分離対象物質が測定対象物質と異なる請求項1～7のいずれか1項による測定対象物質の検出方法、およびこれに関する検出試薬、キットおよび装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は検体中の測定対象物質を磁力を利用して特異的に検出する方法に関し、特に磁力

を利用して免疫学的方法により検体中の測定対象物質を特異的に検出する方法に関する。更に、本発明は、検体中の分離対象物質を磁力を利用して特異的に分離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 検体中の測定対象物質を特異的に検出する方法として、従来から免疫測定法、すなわちイムノアッセイが広く用いられている。イムノアッセイには、検出に使用される標識の種類に応じて、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、蛍光イムノアッセイ、色素イムノアッセイ等がある。

【0003】 イムノアッセイでは、検体中の測定対象物質である特定の抗原または抗体等と特異的に反応する物質(抗体、抗原等)に放射線、酵素、蛍光体、色素等によって標識を付けた標識体を予め準備し、この標識体を検体中の測定対象物質と特異的に反応させて、反応物における標識の発現の有無や強弱等に応じて、該測定対象物質の有無や量を検出する。しかしながら、その場合には、測定対象物質および標識体の一方をビーズ、マイクロプレート等の固体に固定化して、測定対象物質と標識体との反応物を固相として未反応の標識体等を含む液相から分離するか、または測定対象物質と標識体との反応物を含む液相を未反応の標識体を固定化した固相から分離するというB/F分離工程が必要であり、このB/F分離工程はイムノアッセイを複雑なものにしていた。

【0004】 近年、クロマトグラフィー技術をイムノアッセイに利用したイムノクロマトグラフ法と称される方法が開発された(U.R.Chakraborty et al., Ann. Biol. Clin., 1990, 48, 403-408; R.F.Zuk et al., CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 31, No. 7, 1985)。これらの文献に記載されているイムノクロマトグラフ法による場合は、クロマトグラフ媒体の固相上で、抗原・抗体反応と同時に毛管移動によって抗原・抗体反応物と未反応物との分離が行われる。その結果、金コロイド(色素)または酵素で標識された抗体または抗原による特定の標識がクロマトグラフ媒体上に出現し、それによって検体中の測定対象物質の有無や多少を測定することができ、従来のイムノアッセイにおけるB/F分離工程を別途行う必要がない。

【0005】 しかしながら、上記のイムノクロマトグラフ法による場合は、検体中の測定対象物質と特異的に反応する抗体または抗原(大半は抗体)を、標識された抗体または抗原とは別に、クロマトグラフ媒体上に予め固定化しておくことが必要であり、そのためにクロマトグラフ媒体としては、試料の毛管移動に適しているだけでなく、抗体または抗原の固定化に適した特性を有する必要がある、クロマトグラフ媒体の素材に対して種々の厳しい要件が求められる。

【0006】 また、上記のイムノクロマトグラフ法では、クロマトグラフ媒体上に固定化した抗体と標識した

抗原および／または測定対象抗原との反応に伴う表現外形（－、＋のサイン等）、或いは固定化した抗原と標識した抗体および／または測定対象抗体との反応に伴う表現外形を、抗体または抗原をクロマトグラフ媒体に固定化するとき予め定めておかねばならず後で変更することができない。

【0007】更に、上記のイムノクロマトグラフ法では、例えば測定対象物質である抗原（抗体）とクロマトグラフ媒体上に固定化した抗体（抗原）および標識された抗体（抗原）等の反応は、毛管移動時のほんの一瞬である。そのため、測定対象物質である抗原（抗体）を高感度で検出するには、クロマトグラフ媒体上に固定化する抗体または抗原としては、測定対象物質である抗原または抗体、および標識された抗体または抗原と、高レベルで結合する結合定数の高いものが要求され、クロマトグラフ媒体上に固定化する抗体または抗原の種類が限られる。

【0008】

【発明の内容】上記の点から、本発明者は、従来のイムノアッセイにおけるようなB/F分離工程を別途行う必要がなく、しかも上記した従来のイムノクロマトグラフ法におけるような種々の厳しい条件を必要とせず、簡単に且つ高感度で検体中の測定対象物質を検出できる方法を得ることを目的として研究を続けてきた。その結果、検体中の測定対象物質と特異的に反応する物質に磁性を付与しておき、測定対象物質と該特異的反応物質とから磁性を有する反応生成物を形成させ、これをクロマトグラフ媒体の特定位置に設けた磁場に磁力で捕捉すると、上記目的を達成できることを見出して本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、①検体中の測定対象物質を、それと特異的に反応する磁性を有する物質、および該磁性を有する物質とは異なる部位で該測定対象物質と特異的に反応する標識された物質と反応させ、磁性を有し且つ標識された反応生成物を毛管移動させると共に毛管移動媒体の特定の位置で磁力によって捕捉することを特徴とする検体中の測定対象物質の特異的検出方法である。

【0010】更に、本発明は、②検体中の測定対象物質を、それと特異的に反応する磁性を有する物質と、該磁性を有する物質に対して該測定対象物質と競合的に反応する標識された物質の存在下に反応させ、反応生成物を毛管移動させると共に、毛管移動媒体の特定の位置に磁力によって磁性を有する反応生成物を捕捉することを特徴とする検体中の測定対象物質の特異的検出方法である。

【0011】また、本発明は、③検体中の測定対象物質を、それと特異的に反応する標識された物質と、該標識された物質に対して該測定対象物質と競合的に反応する磁性を有する物質の存在下に反応させ、反応生成物を毛

管移動させると共に、毛管移動媒体の特定の位置に磁力によって磁性を有する反応生成物を捕捉することを特徴とする検体中の測定対象物質の特異的検出方法である。

【0012】上記①～③の方法に限定されるものではないが、本発明を検体中の測定対象物質が特定の抗原であり測定対象物質と特異的に反応する物質が抗体であり、そして毛管移動媒体がクロマトグラフである場合を例にとり、以下に図1～4を参照して具体的に説明する。図1は磁石付きのクロマトグラフを側面から見た図であり、図2～図4は①～③の方法による検出結果を正面から見た図である。図1～図4において、1は検体を入れる容器、2はクロマトグラフ媒体、3は裏打ちフィルム、4は磁石（ゴム磁石等）、5は吸水体、そして6は検体を示す。

【0013】まず、①の方法について説明すると、容器1に測定対象物質である抗原（○）を含む通常液状をなす検体6を入れ、これに抗原（○）と特異的に反応する磁性を有する抗体（>＊）（ここで>は抗体、＊は磁性；以後同じ）、および該磁性を有する抗体（>＊）とは異なる部位で抗原（○）と特異的に反応する標識された抗体（>☆）（ここで>は抗体、☆は標識；以後同じ）を加えると、抗原・抗体反応によって、磁性と標識の両方を有する抗原・抗体反応生成物（＊<○>☆）が生成する。

【0014】そして、反応生成物（＊<○>☆）を含む検体がクロマトグラフ媒体上を吸水体5の方に向かって徐々に毛管移動によって吸い上げられてゆくと、図2に見るように、該磁性を有する反応生成物（＊<○>☆）が磁石4を設けた位置で磁石4の形状にほぼ一致した形状に磁力によりクロマトグラフ媒体上に捕捉されと共にその位置で標識（☆）による発現を行う。したがって、クロマトグラフ媒体上の磁石4位置における該標識の発現の有無や強弱、色調等を調べることによって、検体6中における抗原（○）の有無や多少を検出することができる。その場合に、磁石4はどのような形状であってもよいが、例えば方形、円形、星型、花型等々の任意の形状にしておくと、その形状に合致して標識が発現し、測定対象物質の有無の検出がより容易に行われる。また、磁石として電気磁石等を使用してもよい。

【0015】次に、②の方法について説明すると、容器1に入れた測定対象物質である抗原（○）を含む検体6に、抗原（○）と特異的に反応する磁性を有する抗体（>＊）と、該磁性を有する抗体に対して抗原（○）と競合的に反応する標識された抗原（●☆）（ここで●は抗原、☆は標識；以後同じ）を加えると、競合を伴った抗原・抗体反応によって、磁性を有する反応生成物（○>＊）、および磁性と標識の両方を有する反応生成物（＊<●☆）の2者が生成する。

【0016】そこで、これらの反応生成物を含む検体がクロマトグラフ媒体上を吸水体5の方に向かって徐々に

毛管移動によって吸い上げられてゆくと、図3に見るように、磁石4を設けた位置に、上記で生成した2つの反応生成物(○>☆)と(☆<●☆)の両方が磁性を有しているため、両者が磁力によって捕捉される。この場合に、検体6中に抗原(○)が存在しない場合には、磁性のみを有する反応生成物(○>☆)は形成されず、磁性と標識の両方を有する抗原・抗体反応生成物(☆<●☆)のみが形成され、それが磁石4のある位置に捕捉されてその標識の発現が強くなる。これに対して、検体6中に抗原(○)が含まれる場合には、標識を持たず磁性のみを有する反応生成物(○>☆)も磁石4のある位置に捕捉される結果、その位置における標識の発現の程度が低くなる。したがって、磁石4位置におけるクロマトグラフ媒体上の標識の発現の強弱によって、検体中の抗原(○)の有無または多少を検出することができる。

【0017】また、上記③の方法について説明すると、容器1に入れた抗原(○)を含む検体6に、抗原(○)と特異的に反応する標識された抗体(>☆)および該標識された抗体(>☆)に対して抗原(○)と競合的に反応する磁性を有する抗原(●☆)を加えると、競合を伴った抗原・抗体反応により、検体中に標識のみを有する反応生成物(○>☆)と、磁性と標識の両方を有する反応生成物(☆<●☆)の2者が形成される。

【0018】そこで、これらの反応生成物を含む検体がクロマトグラフ媒体上を吸水体5の方に向かって徐々に毛管移動によって吸い上げられてゆくと、図4に見るように、磁石4を設けた位置に、磁性と標識の両方を有する反応生成物(☆<●☆)のみが磁力によって捕捉され、標識のみを有する反応生成物(○>☆)は磁石4位置に捕捉されず、それよりも上部の位置で標識による発現を生ずる場合に、検体中に抗原(○)が存在しない場合には、標識のみを有する反応生成物(○>☆)は形成されず、磁性と標識の両方を有する抗原・抗体反応生成物(☆<●☆)のみが形成されて、それが磁石4位置に捕捉される結果、標識は主に磁石4位置のみ発現するが、検体中に抗原(○)が含まれる場合は、磁石4を経過した位置にも標識による発現が生ずることになり、このことから検体中の抗原(○)の有無や多少を検出することができる。

【0019】そして、上記①～③の方法を実施するのに使用する、検体中の測定対象物質と特異的に反応する磁性を有する物質(以後「物質a b☆」で示す)、物質a b☆とは異なる部位で測定対象物質と特異的に反応する標識された物質(以後「物質a b☆」で示す)、物質a b☆に対して測定対象物質と競合的に反応する標識された物質(以後「物質a g☆」で示す)、および物質a b☆に対して測定対象物質と競合的に反応する磁性を有する物質(以後「物質a g☆」で示す)は、上記①～③の検出を行うたびごとに形成してもよい。しかしながら、本発明で使用する上記物質a b☆、物質a b☆、物質a g☆お

よび物質a g☆はいずれも凍結乾燥等の乾燥処理を施すことによって、変質することなく長期間安定に保存することができるので、物質a b☆、物質a b☆、物質a g☆および物質a g☆の乾燥物を予め形成し保存しておいて、実際の検出を行う際にその必要量を使用するようにするのが便利である。したがって本発明は、上記①～③の方法を実施するのに使用する物質a b☆、物質a b☆、物質a g☆および物質a g☆の乾燥物、更に、それらの乾燥物を上記①～③の検査方法が容易に行えるように組み合わせたものを包含する。

【0020】そして、上記した物質a b☆、物質a b☆、物質a g☆および物質a g☆を乾燥状態でクロマトグラフ媒体等の毛管移動媒体の特定位置に予め配置した検査用キット、更に該検査用キットの特定位置に磁石等の磁場発生部材を配置した検査用キットは、長期保存が可能であり、しかもそのまま直ちに上記した①～③の検出を行うのに使用することができて極めて便利であり、したがって本発明はそのような検出用キットをも包含する。

【0021】上記検査用キットの例を図5および図6により具体的に説明する。図5および図6において、2はクロマトグラフ媒体、3は裏打ちフィルム、4はゴム磁石等の磁石、5は吸水体、および7は試料(検体)採取部を示す。図5の検査用キットでは、試料採取部7と磁石4との間の試料採取部7に近い位置8に、測定対象物質と特異的に反応する物質a b☆および物質a b☆の両方が乾燥状態で同時に施してある。そして、この図5の検査用キットを使用する場合は、試料採取部7に液状の検体を施すと、検体中に含まれる成分が液体と共に毛管移動によって吸水体5の方向に移動し、位置8に到達すると検体中の測定対象物質が物質a b☆および物質a b☆の両方と反応して磁性と標識の両方を有する反応生成物を形成し、その反応生成物が磁石4の位置で磁力によって捕捉されて、その位置で標識による発現を生ずる。

【0022】また、図6の検査用キットでは、試料採取部7と磁石4との間の最初の位置9に物質a b☆を乾燥状態で施し、それと少し離れた第2の位置10に物質a b☆が乾燥状態で施してある。そして、この図6の検査用キットを使用する場合は、試料採取部7に液状の検体を施すと、検体中に含まれる成分が液体と共に毛管移動によって吸水体5の方向に移動し、位置9に到達すると検体中の測定対象物質が物質a b☆と反応して磁性を有する反応生成物を形成し、その反応生成物が毛管移動により更に吸水体5へと移動すると、位置10において更に物質a b☆と反応して磁性と標識の両方を有する反応生成物を形成し、その反応生成物が磁石4の位置で磁力によって捕捉されて、その位置で標識による発現を生ずる。

【0023】上記した検査用キットにおいて、検出に用いる物質a b☆、物質a b☆、物質a g☆および物質a

g*が互いに反応しないときは、クロマトグラフ媒体上の同じ位置に施しておいても、または離しておいてもよい。一方、それらの物質が互いに反応しやすい場合は、同じ位置に施さず、互いに離れた位置に施しておくのが望ましい。また、該検査用キットにおいて、磁石等の磁場発生部材は、最初から検査用キットと一体に設けておいても、または着脱自在に設けておいても、或いは個別に準備しておき各々の検査内容等に応じて検出操作時に適当な磁場発生部材を配置または取り付けのようにしてもよい。

【0024】図5および図6に示した検査用キットは、はんの一例であり、本発明はそれに限定されるものではない。検査用キットに用いる毛管移動媒体、吸水体、裏打ちフィルム等の材質は、この種の検査用キットにおいて従来から知られているいずれのものを使用してもよく、またそれらの形状もストリップ状だけでなく種々の形状とすることができる。また、磁性を有する物質a b*および物質a g*と、標識を有する物質a b☆とa g☆とを互いに異なった色にしておくと、検体検査により、それら複数の色が混ざった種々の色調が得られるので、その色調を調べることによって測定対象物質の多少や濃度等を目視等により判定できる。

【0025】そして、本発明の方法は、免疫学的に特異的に反応する相手が存在する物質（測定対象物質）の検出に特に有効に使用することができる。該測定対象物質は、1つまたは2つ以上の免疫学的に活性な部位を有する生理学的流体、細胞抽出物、組織抽出物中のどのような構成成分でもよく、例えばペプチド、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク、ステロール、ステロイド、糖脂質、核酸、酵素、ホルモン、多糖類、アルカロイド、薬物等を挙げることができる。そのうちでも、本発明は、測定対象物質が特定の抗原または抗体である場合に有効であり、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）、癌胚抗原（CEA）、ヒト成長ホルモン（HGH）、プロラクチン、エストロゲン、潜血ヘモグロビン、ジゴキシン、バルビツール、モルヒネ等の検出に特に有効である。そして、これらの抗原の検出に際しては、それと特異的に反応することが広く知られている抗体を使用することができる。

また、本発明における特異的反応は、免疫学的な抗原・抗体反応の他にも、DNA・RNAの相互作用や酵素基質の反応、更にホルモンとリセプターの反応等の一般的に知られる他の特異的反応であってもよい。

【0026】本発明の上記した①および②の方法で使用する、検体中の測定対象物質と特異的に反応する磁性を有する物質、すなわち物質a b*は、例えば磁性ポリスチレンラテックス、磁性ゴムラテックス等の磁性を付与した（磁性物質を結合させた）ポリマー微粒子；鉄、コバルト、ニッケルまたはそれらの化合物等からなる磁性物質自体；有機ポリマー、ラテックス自体のスピンを変

えて磁性にした有機磁性ポリマーやラテックス；または上記のものを組み合わせた物質等；の磁性を有する材料（通常微粒子）の表面に測定対象物質と特異的に反応する物質を物理吸着、化学反応、結合剤により結合等の方法によって付着させることにより形成することができる。また、測定対象物質と特異的に反応する物質がそれ自体で磁性を有するもの（例えば体内にマグネタイトを持っている細菌等）の場合は、上記のような磁性付与処理を行うことなくそのまま直接使用することができる。また、本発明の③の方法で使用する標識された物質（物質a b☆）に対して測定対象物質と競合的に反応する磁性を有する物質（物質a g*）も、物質a b*の場合と同様の方法によって形成することができる。

【0027】更に、本発明の方法により、検体中の複数種の測定対象物質を同時に検出することも可能である。その場合には、例えば、検体中の複数の測定対象物質の各々に特異的に反応する物質を各々準備し、それらに例えば強さの異なる磁性を付与し、毛管移動媒体にも各々の磁性に適合した複数の磁場を位置をずらして設けておき、毛管移動によって各磁場に反応生成物（例えば上記した抗原・抗体反応生成物）の各々を別々に捕捉するようにするとよい。

【0028】測定対象物質と特異的に反応する物質または測定対象物質と競合的に反応する物質に付ける標識としては、イムノアッセイ等のこの種の検出方法において通常使用されている標識のいずれかが採用でき、例えば放射性物質、酵素、蛍光物質、色素等による標識を挙げることができる。特に、色素標識を使用した場合には、磁場に発現した標識をそのまま直接目視により観察できて便利であり、色素標識の例としては金コロイド、銀コロイド等の金属コロイド、セレン等の非金属コロイド、染料や色素の重合体、着色ラテックス等を挙げることができる。

【0029】また本発明においては、④標識された物質（物質a b☆または物質a g☆）を使用せずに、検体中の特定物質をそれと特異的に反応する磁性を有する物質（物質a b*）と反応させ、その磁性を有する反応生成物を毛管移動させると共に毛管移動媒体の特定の位置で磁力によって捕捉する方法を採用することが可能であり、この場合には、標識がないために該特定物質は検出できないものの、該特定物質を毛管移動媒体の特定位置に磁力によって捕捉し分離することが可能になる。そして、磁力によるこのような捕捉・分離方法を使用した場合には、検体中に含まれていて特定の測定対象物質の検出に妨害となる他の特定の物質を予め分離することができ、測定対象物質の検出をより精密に行うことが可能になる。

【0030】そして、本発明において、上記①～③の方法の一つと上記④の方法を組み合わせた場合には、検体中の測定対象物質の検出・測定と検体中の分離対象物質

の分離を一つの操作で同時に行うことができる。具体的には、例えば、検体中の測定対象物質と分離対象物質の各々に特異的に反応する物質を各々準備しそれらに強さの異なる磁性を各々付与しておき、同時に測定対象物質とのみ特異的に反応する標識された物質を準備し、毛管移動媒体に各々の磁性に適合した2つの磁場を位置をずらして設けておき、毛管移動によって一方各磁場には磁性を有し且つ標識された測定対象物質の反応生成物を捕捉し、もう一方の磁場には磁性を有する分離対象物の反応生成物を捕捉することによって、検体中の測定対象物質を検出・測定すると共に、検体中の分離対象物を同時に分離することができる。以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はそれにより限定されない。

【0031】

【実施例】

《実施例 1》[上記①の方法によるHCGの検出試験]

磁性ポリスチレン粒子の調製

Polyscience Inc. 製の磁性ポリスチレン粒子を蒸留水4mlに懸濁し、Advanced Magnetic Inc.製のBioMag[®]で30秒処理し、凝集した粒子を除去し、更に10分間処理して磁性ポリスチレン粒子を沈殿させて回収した。

【0032】磁性を有する抗HCGポリクロナル抗体(PoAb)の調製

上記で調製した磁性ポリスチレン粒子の沈殿物100mgにPoAb0.1mg/ml50mM炭酸緩衝液(pH9.5)を1ml加え、4℃で一昼夜震盪して、磁性ポリスチレン粒子表面にPoAbを物理吸着させた後、遠心分離を行って磁性を有するPoAbを回収した。

【0033】金コロイド標識を有する抗HCGモノクロナル抗体(MoAb)の調製

蒸留水1リットルを80℃に加熱して、これにHAuCl₄・0.1g/10ml蒸留水の溶液を加えた。水酸化カリウムでpHを4.0~4.5に調節したリンゴ酸0.2g/20ml蒸留水の溶液を急速に加えて激しく攪拌した。30~90秒以内に溶液の色が黄白色から赤褐色に変化して、金コロイドヒドロゾルが形成された。80℃*

*で更に1時間加熱した後、室温に冷却して、遠心分離して金コロイドヒドロゾルを分取した。MoAb 15μg/ml 3mMリン酸緩衝液(pH8.0)中に上記で調製した金コロイドヒドロゾルを光波長530nmにおける吸光度A₅₃₀。(以後同様に標記する)が1.0になるように加えて一昼夜震盪してMoAbに金コロイドを吸着させた後、遠心分離を行って金コロイドで標識されたMoAbを回収した。

【0034】検査用キットの作成

図1に示すように、厚さ50μmのポリエチレンテレフタレート製の裏打ちフィルム4にナイロン・テトロン混紡織物(厚さ250μm)からなる毛管移動媒体2を貼付けた幅8mm、長さ50mmの細長いストリップの上部にセルロース濾紙からなる縦×横×厚さ=20mm×20mm×5mmの吸水体5を取り付け、また該ストリップの下端から約20mmの位置で裏打ちフィルム側に幅×長さ×厚さ=8mm×1mm×1mmのゴム磁石4。(パイロット社製：マグシート)を取り付けて検査用キットを作成し、この検査用キットを複数個用意した。

【0035】HCGの検出試験

1%ウシ血清アルブミン(BSA)0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)1mlに、上記で調製した磁性を有するPoAbをA₅₃₀が1.0になるように加え、更にこの液に上記で調製した金コロイドで標識されたMoAbをA₅₃₀が1.0になるように加えた液を3つ準備した。

そのうち、第1の液にはHCGを50mIU/ml、第2の液にはHCGを500mIU/ml加え、そして第3の液にはHCGを加えないで検査用の液(検体)をつくり、各検査用液を図1に示した容器1の各々に分別して入れた。上記で作成した検査用キットを、HCGを含有するまたは含有しない上記の検査用液を入れた容器1の各々に、その下端から4mmまでが液中に浸かるようにして5分間浸漬した。その後、各検査用キットを容器1から取り出して、磁石4を取り付けた位置における着色(紫色)の有無を目視により観察したところ、下記の表1に示す結果を得た。

【0036】

【表1】

HCG濃度(mIU/ml)	0	50	500
---------------	---	----	-----

判定結果	着色なし	薄紫色に着色	濃紫色に着色
------	------	--------	--------

【0037】上記表1の結果から、本発明の方法による場合は、検体中の測定対象物質(HCG)が極めて簡単な操作で、感度よく検出できることがわかる。

【0038】《実施例 2》[上記②の方法によるHCGの検出試験]

酵素(ペルオキシダーゼ)で標識したHCGの調製

ペルオキシダーゼ(POD)にモル比で10倍のN-サクシンイミジル-3-(2-ヒリジルジチオ)プロピオネ 50

ート(SPDP)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)中で30℃で30分反応させた後、0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.5)中で透析した。次に、ジチオスレイトール(DTT)を50mMになるように加えてPODに導入したSPDPを還元してSH基を露出させた。次いで、5mMのEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて脱塩カラムにかけて過剰のDTTを除いて、SH導入PODを調製した。一方、HCG

にモル比で10倍のスルホサクシンイミジル-4-CN-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(S-SMCC)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)中で30℃で30分反応させた後、同じリン酸緩衝液を使用して脱塩カラムにかけて、マレイミド化HCGを10mg/mlの濃度で含有する液を調製した。上記で調製したマレイミド化HCG含有液に、上記で調製したSH導入PODを5mg/ml以上の割合で混和し、4℃で一昼夜反応させた。反応物をセファクリルS-300カラム(ファルマシア社製)を使用して精製してPOD標識HCGを得た。

【0039】HCGの検出試験

1%BSA0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)1mlに、実施例1で使用したのと同じ磁性を有するPoAbをA₄₉₀が1.0になるように加え、更にこの液に上記で調製したPOD標識HCGを0.01μg/mlの割合で加えた液を4つ準備した。

そのうち、第1の液にはHCGを10mIU/ml、第2の液にはHCGを100mIU/ml加え、第3の液にはHCGを1000mIU/ml加え、そして第4の液にはHCGを加えないで検査用の液(検体)をつくり、各検査用液を実施例1で使用したのと同じ検査用キットを使用して実施例1と同様にして5分間浸漬した。その後、各検査用キットを容器1から取り出して、更に0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)中に5分間浸漬してクロマト処理した。次いで、0.015% H_2O_2 、2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩(ABTS)を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.0)0.1mlを検査用キットの磁石取り付け位置に相当する毛管移動媒体上に施して室温で5分間反応させた後、その部分における410nmにおける反射吸光度を測定した。その結果を図7に示す。

【0040】図7の結果から、検体中のHCGの濃度と410nmにおける反射吸光度とはほぼ一定の直線関係にあることがわかる。したがって、特定の検査用キットに対して図7に見るような検量線を予め作成しておき、該検査用キットを使用して実際の検体を試験した時に得られた値(反射吸光度)を該検量線に対比することによって、実際の検体中のHCGの有無や濃度の検出ができる。

【0041】《実施例3》[図5の検査用キットを使用した①の方法によるHCGの検出]

黄色を有する磁性ポリスチレン粒子の調製

実施例1で使用したのと同じ磁性ポリスチレンラテックス0.5mlを精製水4mlに懸濁した後、Advanced Magnetic Inc.製のBioMag[®] Separatorを使用して1分間処理して、重い磁性粒子や磁気量の多い粒子を磁力で吸*

*引して沈殿させて除去した。上澄み液を分別して容器に入れ、上記のBioMag[®] Separatorを使用して更に10分処理して、磁性を有するポリスチレン微粒子を磁力で集めて回収した。

【0042】黄色を有する磁性PoAbの調製

上記で回収した磁性を有するポリスチレン微粒子の表面に実施例1におけるのと同様にしてPoAbを物理吸着させた後、遠心分離を行って黄色を有する磁性PoAbを得た。

【0043】青色標識を有するMoAbの調製

アミノ基を有するポリスチレンラテックス粒子(青色)0.1gを0.1%グルタルアルデヒド水溶液1ml中に入れて、室温で30分間処理した後、遠心分離して回収した。これをMoAb1mg/ml10mMリン酸緩衝液(pH8.0)2ml中に懸濁し、室温で2時間反応させた後、1Mグリシン水溶液(pH8.0)を1ml加えて更に2時間反応させた。遠心分離により反応物を回収して、1%BSA0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁させた後、遠心分離して青色標識を有するMoAbを回収した。

【0044】検査用キットの作成

厚さ50μmのポリエステル製の裏打ちフィルム4にナイロン・テロン混紡織物(厚さ250μm)からなる毛管移動媒体2を貼付けた幅8mm、長さ80mmの細長いストリップを用意した。上記で調製した黄色を有する磁性PoAbおよび青色標識を有するMoAbをそれぞれA₄₉₀1.01、A₄₉₀1.01になるような量で3%BSA0.1Mショ糖液に加えた液10μlを、レーヨン不織布(厚さ150μm、長さ10mm、幅10mm)に含浸させ、凍結乾燥した後、この不織布を、上記のストリップの左端から10~20mmの位置に亘って軽く圧着した。次に、該ストリップの右端部に縦×横=20mm×20mmのNo.1濾紙からなる吸水体5を取り付け、また左端には親水性多孔性プラスチックからなる幅×長さ×厚さ=8mm×40mm×4mmの試料採取部7を取り付け、更に該ストリップの左端から約50mmの位置で裏打ちフィルム側に幅×長さ×厚さ=8mm×2mm×1mmのゴム磁石4(パイロット社製;マグシート)を取り付けて、図5に示した検査用キットを作成した。

【0045】HCGの検出試験

HCGを各100mIU/ml、500mIU/mlを加えた液、更にHCGを加えない液の3種類の液を調製し、上記で作成した検査用キット3個の各々の試料採取部7に各液を1ml含ませた。5分放置した後、毛管移動媒体2の磁石4取り付け位置における呈色状態を目視により観察したところ、下記の表2に示す結果を得た。

【0046】

【表2】

HCG濃度(mIU/ml)	0	100	500

呈色状態

黄色

緑色

ほぼ青色

【0047】上記表2の結果から、測定対象物質と特異的に反応する磁性を有する物質（物質a b*）と標識を有する物質（物質a b☆）とを異なった色にしておくと、検体中の測定対象物質の濃度に応じて磁石位置に発現する呈色状態が変化すること、したがって濃度の変化に応じた標準色調表を作成しておくこと、その標準色調表との対比によって、実際の検体中の測定対象物質の濃度を

【0048】《実施例 4》[図6の検査用キットを使用した④の方法によるHCGの検出]

検査用キットの作成

ポリエチレンテレフタレート製の裏打ちフィルム4にテトロン・ナイロン混紡織物からなる毛管移動媒体2を貼付けた実施例3で用いたのと同じ細長いストリップ複数個用意した。該ストリップの左端から10mmの位置に実施例1におけるのと同様に調製した磁性を有するPoAbを含有するA_{1,2}が1.0の1%BSA 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を施し、更に該ストリップの左端から30mmの位置に実施例1におけるのと同様に調製した金コロイド標識を有するMoAbを含有するA_{1,2}が1.0の1%BSA 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を施した後凍結乾燥した。次に、該ストリップの右端部に実施例3と同様にしてNo. 1濾紙からなる吸水体5を取り付け、また左端には多孔質の親水性試料採取部7を取り付け、更に該ストリップの左端から約60mmの位置で裏打ちフィルム側に実施例3と同様にゴム磁石4を取り付けて、図6に示した検査用キットを作成した。

【0049】HCGの検出試験

HCGを各々0、20、50、100および200mIU/ml加えた試験液調製し、上記で作成した検査用キットの各々の試料採取部7に各試験液を1ml含ませた。5分放置した後、毛管移動媒体2の磁石4取り付け位置における呈色状態を目視により観察したところ、その検出限界は50mIU/mlであった。

【0050】《比較例 1》実施例4に使用した検査用キットの磁石4を取り外し、毛管移動媒体2の磁石4のあった位置に、キット上に施した磁性を有するPoAb量と等しくなるように極細ニードルを使用してPoAb液を更にスポット状に施して(PoAb約0.2μg)、比較用の検査用キットを複数個作成した。この比較用の検査用キットの各々に、実施例4と同様にしてHCGを各々0、20、50、100および200mIU/ml加えた試験液をその試料採取部7に各1ml含ませた。5分間放置した後、毛管移動媒体2のPoAbスポットを施した位置における呈色状態を目視により観察したところ、その検出限界は100mIU/mlであった。

【0051】上記実施例4および比較例1の結果から、

特定の位置に磁石を取り付けた実施例4の本発明の検査用キットの場合は、磁石のない比較例1の検査用キットに比べてその検出感度が2倍にもなり大幅に向上することがわかる。

【0052】

【発明の効果】本発明による場合は、従来のイムノアッセイにおけるような測定対象物質および標識体の一方をビーズ、マイクロプレート等の固体に固定化して、測定対象物質と標識体との反応物を固相として未反応の標識体等を含む液相から分離するか、または測定対象物質と標識体との反応物を含む液相を未反応の標識体を固定化した固相から分離するというB/F分離工程が不要であり、検体中の測定対象物質を簡単に検出することができる。

【0053】また、本発明による場合には、これまで知られたイムノクロマト法と異なり、検体中の測定対象物質と特異的に反応する抗体または抗原（大半は抗体）を標識された抗体または抗原とは別に、クロマトグラフ媒体上に予め固定化しておくことが不要であるため、毛管移動媒体（クロマトグラフ媒体）は試料の毛管移動に適した特性を備えているだけでよく、毛管移動媒体の素材に対して厳しい要件が不要である。

【0054】更に、本発明による場合には、標識の発現外形を適宜変更した形で設定でき、測定対象物質とそれと特異的に反応する物質は毛管移動媒体上を徐々に移動しながら長時間に亘って確実に行われるので、測定対象物質との結合定数が比較的低い物質でも使用でき、しかも測定対象物質を高感度で検出できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明で使用する磁石付きのクロマトグラフを側面から見た図である。

【図2】図1の磁石付きのクロマトグラフを使用して、④の方法により検出を行った結果を正面から見た図である。

【図3】図1の磁石付きのクロマトグラフを使用して、②の方法により検出を行った結果を正面から見た図である。

【図4】図1の磁石付きのクロマトグラフを使用して、③の方法により検出を行った結果を正面から見た図である。

【図5】本発明の検査用キットの一例を示す図である。

【図6】本発明の検査用キットの別の例を示す図である。

【図7】実施例2の測定結果を示した図である。

【符号の説明】

1 検体を入れる容器

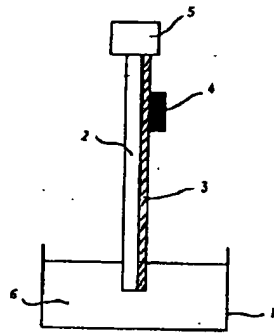
2 クロマトグラフ媒体

- 3 裏打ちフィルム
4 磁石
5 吸水体
6 検体
7 試料採取部

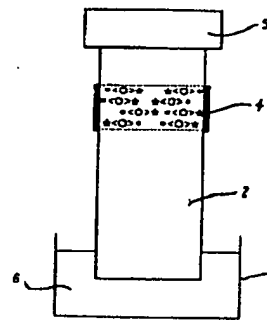
- * 8 磁性物質 (物質 a b*) および標識物質 (物質 a b ☆) の配置位置
9 磁性物質 (物質 a b*) の配置位置
10 標識物質 (物質 a b ☆) の配置位置

*

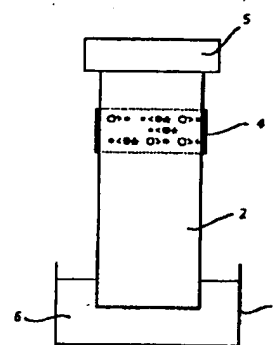
【図1】



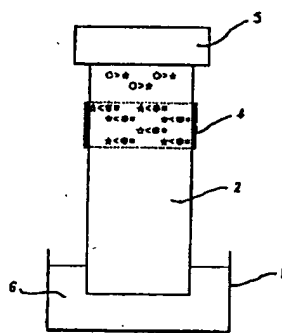
【図2】



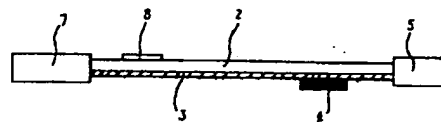
【図3】



【図4】

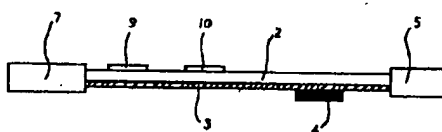


【図5】

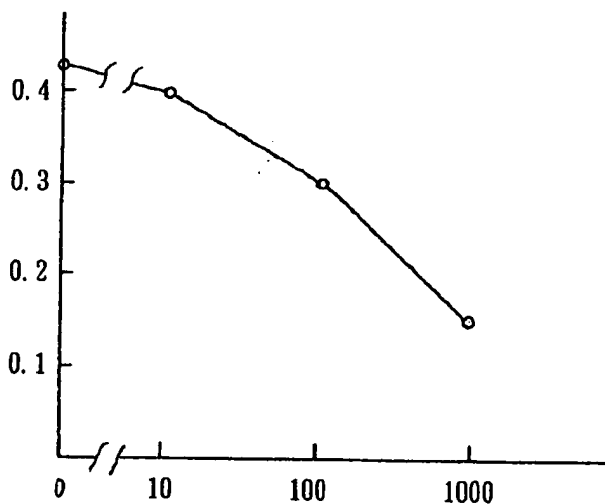


【図7】

【図6】



反
射
吸
光
度



HCG 濃度 (mIU/ml)